

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 199 61 302 A 1

51 Int. Cl. 7:
A 61 K 31/4995

21 Aktenzeichen: 199 61 302.8
22 Anmeldetag: 18. 12. 1999
43 Offenlegungstag: 21. 6. 2001

71 Anmelder:
Arzneimittelwerk Dresden GmbH, 01445 Radebeul,
DE
74 Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

72 Erfinder:
Marx, Degenhard, Dr., 01445 Radebeul, DE; Höfgen,
Norbert, Dr., 01458 Ottendorf-Okrilla, DE; Egerland,
Ute, 01445 Radebeul, DE; Szelenyi, Stefan, Prof.,
90571 Schwaig, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE 195 10 965 A1
EP 04 00 583 A1

MUTSCHLER, Ernst: Arzneimittelwirkungen,
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH,
Stuttgart, 1991, S.404;
HELWIG, Helmut, OTTO, Hans-Hartwig:
Arzneimittel,
Bd.I, Kapitel 1-30, 9.Aufl., 1998, Wissenschaft-
liche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S.10,11;
Chemical Abstract, 132:202635r;

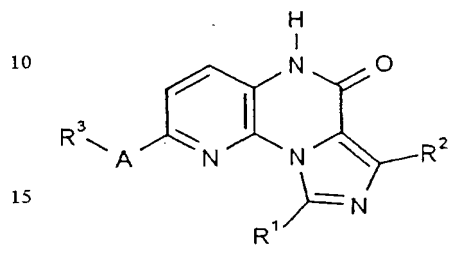
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- 54 Verwendung von Imidazo(1,5-a)-pyrido(3,2-e)-pyrazinonen als duale Inhibitoren der Phosphodiesterase 5 und der Phosphodiesterase 3 zur Therapie der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen
- 57 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Imidazo(1,5-a)-pyrido(3,2-e)-pyrazinonen der Formel 1 als duale Inhibitoren der Phosphodiesterase 3 und der Phosphodiesterase 5 zur Therapie der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen.

DE 199 61 302 A 1

DE 199 61 302 A 1

Diese Erfindung betrifft die Verwendung von Imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinonen der Formel 1 als Wirkstoffe zur Behandlung der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen sowie pharmazeutische Zubereitungen, die diese Verbindungen enthalten.

**1**

Stand der Technik

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen weltweit. In den WHO Mitgliedsländern waren 1998 30,9% aller Todesfälle auf Herz-Kreislaufkrankungen zurückzuführen und davon allein 13,7% auf koronare Herzerkrankungen (The World Health Report 1999). Kardiovaskuläre Erkrankungen betreffen jedoch nicht nur ältere Personen, sondern treten bereits ab dem 3. Lebensjahrzehnt gehäuft auf. Sie beeinträchtigen nicht nur die Lebensqualität der Patienten, sondern haben, bedingt durch direkte und indirekte Kosten, eine hohe ökonomische Bedeutung. Neben genetischen Faktoren spielen bei der Pathogenese von Herz-Kreislaufkrankungen vor allem Fehlernährung und Übergewicht, Alkohol- und Nikotinabusus sowie ein Mangel an körperlicher Bewegung eine Rolle.

Ein häufiges Krankheitsbild ist die koronare Herzkrankheit, unter der die Angina pectoris und der Herzinfarkt zusammengefaßt werden. Die Angina pectoris ist ein multifaktorielles Krankheitsbild, das durch eine Atherosklerose der Koronararterien verursacht wird. Durch flußlimitierende Koronarstenosen kommt es zu einer Minderdurchblutung der Herzmuskulatur in Form einer stabilen oder instabilen Angina pectoris, einer stummen Myokardischämie, ischämisch bedingter Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen oder einem akuten Myokardinfarkt. Der Herzinfarkt wird durch den Verschluß einer Koronararterie mit einem Thrombus (Blutpfropf) hervorgerufen. Der Thrombus bleibt meistens an einer Verengung der Herzkranzgefäße stecken. Die dahinter liegenden Regionen des Herzmuskels werden dann nicht mehr mit Blut versorgt. Je nach Ort des Infarkts können große oder weniger große Bereiche betroffen sein.

Die Basistherapie besteht in der Elimination der bekannten Risikofaktoren und einer medikamentösen Thrombozytenaggregationshemmung mittels Acetylsalizylsäure oder Ticlopidin. Zur Behandlung der Angina pectoris-Anfälle werden Gefäßdilatoren wie Nitrate, Betarezeptorenblocker oder Calciumantagonisten verwendet, die jedoch unerwünschte Wirkungen wie Hypotonie, Blutumverteilung (steal-Phänomen) oder cardiodepressive Nebenwirkungen haben können. Bei Patienten mit genau lokalisierter Koronarstenose kann eine Bypass-Operation erfolgen (Leitlinie: Koronare Herzkrankheit/Angina pectoris. Leitlinie 019/001 vom 22. Juni 1998 der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung in der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften).

Eine weitere bedeutende Erkrankung ist die Herzinsuffizienz. Durch verschiedene Faktoren bedingt, reicht die Pumpleistung des Herzens nicht mehr aus, die Blut- und somit Sauerstoffversorgung des Körpers zu gewährleisten. Unterschieden werden drei Formen der Herzinsuffizienz, die Rechtsherz-, die Linksherz und die globale Herzinsuffizienz. Bei der Rechtsherzinsuffizienz ist die rechte Herzkammer nicht mehr in der Lage, die erforderliche Menge Blut in den Lungenkreislauf zu pumpen. Da aber immer weiter Blut aus dem Körperkreislauf am rechten Herzen ankommt, weil die linke Herzkammer ununterbrochen weiter arbeitet, staut sich das Blut zurück in den Bauch, die Leber und sogar bis in die Beine.

Von der Linksherzinsuffizienz spricht man, wenn die linke Herzkammer nicht mehr die erforderliche Leistung bringt. In diesem Fall staut sich das Blut in den Lungen. Bei der globalen Herzinsuffizienz sind beide Herzkammern betroffen, oft als Folge einer vorangegangenen Rechts- oder Linksherzinsuffizienz.

Bei der Behandlung der Herzschwäche steht zuerst immer die Grunderkrankung im Vordergrund, z. B. Herzrhythmusstörungen (und andere Herzerkrankungen) oder Hypertonie. Des weiteren werden häufig Medikamente zur Stärkung oder zur Entlastung des Herzens (je nach Ursache der Herzschwäche) und entwässernde Medikamente (Diuretika, Volumenentlastung) verordnet. Häufig werden Herzglykoside (z. B. Digoxin, g-Strophanthin) verordnet, welche die Herzarbeit "ökonomisieren" und über einen längeren Zeitraum eingenommen werden können. Hemmer der Phosphodiesterase 3 (PDE 3) erhöhen im Myokard die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welche über verschiedene cAMP-abhängige Proteinkinasen die Kontraktionskraft erhöhen. In verschiedenen klinischen Studien konnte gezeigt werden, daß PDE 3-Hemmer (Amrinon, Milrinon) deutlich positiv inotrop sind, eine Daueranwendung jedoch die Lebenserwartung eher verkürzt. Daher dürfen diese Substanzen nur für die Behandlung akuter Stadien (Anwendungsdauer 2-3 Wochen) eingesetzt werden. Dies trifft auch für die Anwendung von β -Adrenozeptoragonisten wie Dopamin und Dobutamin zu, die eine direkte positiv inotrope Wirkung haben, jedoch nur zur Behandlung einer akuten Phase der Herzinsuffizienz geeignet sind.

Zur Senkung der sog. Nachlast werden Hemmstoffe des Angiotensin Converting Enzymes (ACE-Hemmer, z. B. Captopril, Enalapril) oder Angiotensinrezeptorantagonisten (z. B. Losartan), selektive α 1-Adreno-Rezeptorenblocker (z. B. Prazosin) oder organische Nitrate eingesetzt.

Nur in absolut notwendigen Fällen wird eine Herztransplantation vorgenommen. Sie ist die letzte Möglichkeit, wenn alle anderen Maßnahmen fehlgeschlagen sind. Obwohl inzwischen Transplantationen, auch an anderen Organen, zur Routine geworden sind, sind Herztransplantationen nicht unproblematisch.

Eine pulmonale Hypertonie liegt vor, wenn der Lungenarteriendruck über 25 mm Hg ansteigt. Dies führt nachfolgend zur Entwicklung eines Cor pulmonale (Vergrößerung des rechten Ventrikels). Bei der primären Hypertonie sind die Ursachen unklar. Möglich sind eine genetische Prädisposition oder medikamentöse Ursachen. Die primäre pulmonale Hypertonie betrifft besonders Frauen in der dritten Lebensdekade. Die sekundäre pulmonale Hypertonie wird durch kapilläre Zirkulationsstörungen ausgelöst und kann verschiedene Ursachen haben. Präkapilläre Stauungen treten durch Verengungen der Lungenarterien beim obstruktiven Lungenemphysem, den Status Asthmaticus, Lungenfibrose oder Embolien auf. Die Therapie besteht in der Verminderung des pulmonalen Druckes und somit Entlastung der rechten Herzkammer. Bisher stehen nur Substanzen zur Verfügung, die unselektiv gefäßdilatorisch wirken (ACE-Hemmer, Ca-Antagonisten-Dihydropyridine) oder nur experimentell angewandt werden (Inhalatives Stickoxid (NO), Epoprostenol (PGI₂) oder Prostacyclin, Adenosine und PGE₁, Medical and Surgical Treatment of Advanced Pulmonary Hypertension By Kenneth W. Presberg, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Medical College of Wisconsin. Thoracic Medical and Surgical Management, Volume III, Number 2 1996).

Phosphodiesterasen (PDE) sind eine Isoenzym-Familie, zu der bisher 10 verschiedene Isoenzyme zugeordnet werden konnten. PDE-Enzyme spalten durch Hydrolyse cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) bzw. cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), die als "second messengers" in einer Vielzahl von Zellen vorkommen. Die Phosphodiesterase 3 (PDE 3) ist cAMP-spezifisch, die Phosphodiesterase 5 (PDE 5) ist cGMP-spezifisch.

Von den bekannten Hemmstoffen der Phosphodiesterasen haben bisher nur einige selektive Inhibitoren der PDE 3, wie bereits beschrieben, begrenzte therapeutische Verwendung bei Herzinsuffizienz gefunden.

Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinonen der Formel 1 als Wirkstoffe zur Behandlung der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen, die zugleich und vergleichbar stark die PDE 3 und PDE 5 inhibieren.

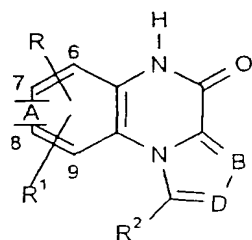
Die Hemmung der PDE 3 in der Herzmuskulatur führt in an sich bekannter Weise zu einer Steigerung der Herzkontraktilität (positiv inotrope Wirkung).

Die Hemmung der PDE 5 führt zur Vasodilatation, besonders in den arteriellen Gefäßen, und vermindert somit z. B. den Gefäßwiderstand in den Coronargefäßen oder der A. pulmonalis.

Die gleichzeitige Nutzung beider Wirkprinzipien, also der positiv inotropen Wirkung am Herzen kombiniert mit der Druckentlastung durch Dilatation arterieller Gefäße durch ein und denselben Wirkstoff, ist bisher unbekannt und wird durch die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 erstmals technisch realisiert.

Imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinone sind als duale Inhibitoren der PDE 3 und PDE 5 bisher völlig unbekannt.

Das Europa-Patent 0 400 583 betrifft Imidazochinoxaline der allgemeinen Formel

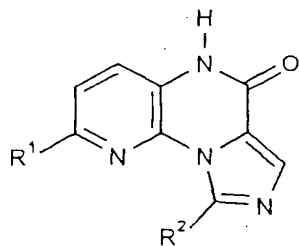


arterieller Gefäß

worin A für die Positionen 7 oder 8 ein Stickstoffatom oder CH, B und D ein Stickstoffatom oder CH beziehungsweise ein substituiertes Kohlenstoffatom bedeuten und die Reste R, R¹, R² Wasserstoff oder verschiedene organische Substituenten darstellen.

Für diese Verbindungen wird eine gefäßerweiternde Wirkung angegeben.

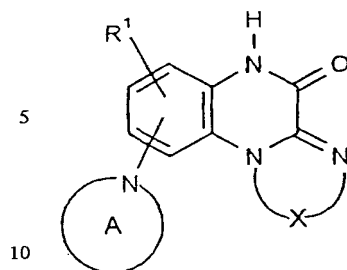
Von D. D. Davey et al. (J. Med. Chem. 34 (1991), 2671-2677) wurden neben verschiedenen Imidazo[1,2-a]-chinoxalinonen auch 2 Imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinone der Formel



beschrieben, für die zum einen R¹ = H und R² = C₂H₅, sowie zum anderen R¹ = 2-Methylimidazo- und R² = CH₃

bedeuten. Beide Verbindungen werden als PDE 3 Inhibitoren mit positiv inotroper Wirkung charakterisiert.

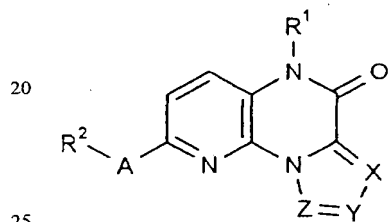
Die Patentanmeldung WO 93/20 077 bezieht sich auf Imidazochinoxalinone der allgemeinen Formel



wobei A für 5-Ring-Heterocyclen mit 2 oder 3 Stickstoffatomen im Ring steht, R^1 NO_2 oder CF_3 sein kann und X für verschiedene, zum Teil Stickstoff enthaltende Ketten mit bis zu 4 Kettengliedern steht.

Diese Verbindungen werden als Glutamat-Rezeptor Antagonisten mit psychotroper sowie antiischämischer Wirkung beschrieben.

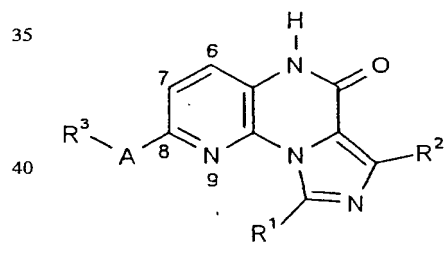
Im Patent DE 195 10 965 werden Pyrido[3,2-e]-pyrazinone der Formel



beansprucht. Dazu gehören auch Imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinone. Für diese wurde R^1 jedoch nur dann als Wasserstoff erklärt, wenn $A = \text{N-R}^3$ ($R^3 = \text{H}$, $\text{C}_1\text{...6-Alkyl}$) bedeutet. Für die beanspruchte Stoffgruppe wurden antiasthmatische und antiallergische Eigenschaften dargestellt.

Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung betrifft Imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinone der Formel 1



worin
A für O oder NH steht,
 R^1 und R^2 gleich oder verschieden sein können und Wasserstoff, sowie
- $\text{C}_1\text{...5-Alkyl}$, geradkettig oder verzweigt, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, - NH_2 , - NO_2 , -CN, -COOH, -F, -Cl, -Br, -I, -O- $\text{C}_1\text{...6-Alkyl}$, -S- $\text{C}_1\text{...6-Alkyl}$ bedeuten können und
 R^3 für Wasserstoff, sowie
- $\text{C}_1\text{...5-Alkyl}$, geradkettig oder verzweigt, ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, - NH_2 , - NO_2 , -CN, -COOH, -F, -Cl, -Br, -I, -O- $\text{C}_1\text{...6-Alkyl}$, -S- $\text{C}_1\text{...6-Alkyl}$ oder Phenyl steht.

Es ist ein wesentlicher Bestandteil dieser Erfindung, daß die Verbindungen gemäß Formel 1 als essentielle strukturelle Voraussetzung für die erfindungsgemäße Anwendung als Therapeutika zur Behandlung der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen sowohl in Position 9 ein Stickstoff-Atom besitzen, als auch das Fragment A mit $A = \text{O}$ oder NH vorhanden ist.

Die Erfindung betrifft auch die physiologisch verträglichen Salze der Verbindungen nach Formel 1, die durch Neutralisation der Basen mit anorganischen oder organischen Säuren bzw. durch Neutralisation der Säuren mit anorganischen oder organischen Basen bzw. durch Quaternisierung tertiärer Amine zu quaternären Ammoniumsalzen gewonnen werden können.

Bei Verbindungen nach Formel 1 mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom betrifft die Erfindung die D-Form, die L-Form und D,L-Mischungen sowie im Falle mehrerer asymmetrischer Kohlenstoffatome die diastereomeren Formen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 mit $A = \text{O}$, ihre physiologisch verträglichen Salze, Razemate,

Diastereomere bzw. Stereoisomere sind an sich bekannt und wurden bereits durch die deutsche Patentanmeldung DE 199 02 082 beansprucht. An gleicher Stelle wurde ebenfalls beschrieben, daß diese Verbindungen Inhibitoren der Phosphodiesterase 5 sind.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 mit A = NH sind an sich bekannt aus dem Patent DE 195 10 965, auf das bereits im Stand der Technik verwiesen wurde.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 können sowohl systemisch, beispielsweise intravenös, intramuskulär, subcutan, als auch oral appliziert werden.

Die orale Applikation der erfindungsgemäßen Verbindungen ist besonders bevorzugt.

Es ist weiterhin Bestandteil dieser Erfindung, daß die in den Ausführungsbeispielen beschriebene Lösung der erfindungsgemäßen Verbindungen für die orale Applikation besonders bevorzugt verwendet wird.

Die Verbindung kann als Lösung auch parenteral, buccal oder sublingual angewandt werden.

Arzneimittel, die eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 neben üblichen physiologisch verträglichen Trägern und/oder Verdünnungsmitteln bzw. Hilfsstoffen enthalten sowie Verfahren zur Herstellung dieser Arzneimittel sind ebenfalls Bestandteil dieser Erfindung.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 und die Arzneimittel, die die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 enthalten, können sowohl einzeln, als auch in Kombination untereinander eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 hemmen die PDE 3 und die PDE 5 in vitro zugleich und vergleichbar stark.

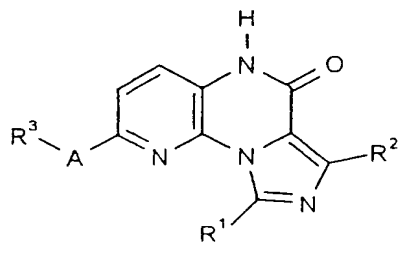
Es wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 in vivo eine Steigerung der Herzkontraktilität (positiv inotrope Wirkung) und zugleich eine Vasodilatation, besonders in den arteriellen Gefäßen bewirken.

Es ist Bestandteil dieser Erfindung, daß durch das beschriebene duale Wirkprinzip der erfindungsgemäßen Verbindungen die Gefahren gravierender Blutdruckveränderungen bzw. von hypoxisch bedingten Arrhythmien zurückgedrängt werden können.

Es ist Gegenstand dieser Erfindung, daß die Verbindungen der Formel 1 besonders für die Behandlung der Akutphase der Herzinsuffizienz, der koronaren Herzkrankheit und des Cor pulmonale verwendet werden können.

Ausführungsbeispiele

Von den Verbindungen der Formel 1, die erfindungsgemäß als Wirkstoffe für die Therapie der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen, verwendet werden können, werden folgende beispielhaft angeführt:



Verb.	A	R ¹	R ²	R ³	Schmelzpkt. [°C]
1	O	C ₃ H ₇	CH ₃	CH ₃	294-295 (DMF)
2	O	H	H	CH ₃	314-317 (DMF)
3	O	H	CH ₃	CH ₃	321-323 (DMF)
4	O	CH ₃	H	CH ₃	309-311 (DMF)
5	O	C ₃ H ₇	H	CH ₃	289-290 (DMF)
6	O	C ₂ H ₅	CH ₃	H	320 zers. (DMF)
7	O	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	314-315 (DMF)
8	NH	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₂ -C ₆ H ₅	276-278 (DMF)
9	O	C ₂ H ₅	CH ₃	(CH ₂) ₃ -OH	303-305 zers. (DMF)

Herstellung einer oral applizierbaren Lösung für die Verbindung 1

Die Verbindung 1 kann zum Beispiel im Verhältnis von 10–50 mg pro ml in 1 N Salzsäure gelöst werden. Bei weiterer Verdünnung mit destilliertem Wasser, dem 10 Volumen% Polyethylenglycol-660-12-hydroxystearat (Solutol® HS 15) zugesetzt werden, im Verhältnis 1 : 9 erhält man eine klare Lösung, die 1–5 mg/ml der Verbindung 1 enthält und als Trink- oder Injektionslösung verwendet werden kann.

Bestimmung der pharmakologischen Eigenschaften

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel 1 sind duale Inhibitoren der Phosphodiesterase 3 und der Phosphodiesterase 5. Ihr therapeutisches Potential wird in vitro beispielsweise durch die Verstärkung der Wirkung von NO auf die intrazellulären cGMP-Spiegel in Fibroblasten der Ratte belegt.

Inhibition der Phosphodiesterase 3

Die PDE 3-Aktivität wird in Enzympräparationen aus humanen Thrombocyten bestimmt. Humanes Blut wurde mit Citrat anticoaguliert. Durch eine Zentrifugation bei 700 × g für 20 Minuten bei Raumtemperatur wird das thrombocytenreiche Plasma im Überstand von den Erythrocyten und Leukocyten getrennt. Die Thrombocyten werden durch Ultraschall lysiert und im PDE 3-Assay eingesetzt. Die Phosphodiesterase-Aktivität wird mit einigen Modifizierungen nach der von Thompson et al. beschriebenen Methode bestimmt. (Thompson, W. J.; Appleman, M. M., Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the enzyme. Adv. Cycl. Nucl. Res. 1979, 10, 69–92).

Die Reaktionsmischungen enthalten 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, die Inhibitoren in variablen Konzentrationen, die Enzympräparation sowie die zur Erfassung des einzelnen Isoenzymes PDE 3 notwendigen weiteren Komponenten (siehe unten). Durch die Zugabe des Substrates 0,5 µM [³H]-cAMP (ca. 6000 CPM/Test) wird die Reaktion gestartet. Das Endvolumen beträgt 100 µl.

Testsubstanzen werden als Stammlösungen in DMSO angesetzt. Die DMSO-Konzentration im Reaktionsgemisch ist 1% v/v. Bei dieser DMSO-Konzentration wird die PDE 3-Aktivität nicht beeinflusst. Nach dem Start der Reaktion mittels Substratzugabe werden die Proben 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch ein Erhitzen der Testtubes für 2 Minuten auf 110°C wird die Reaktion gestoppt. Die Proben bleiben für weitere 10 Minuten im Eis. Nach der Zugabe von 30 µl 5'-Nukleotidase (1 mg/ml, aus einer Schlangengiftsuspension aus Crotalus adamanteus) erfolgt eine Inkubation für 10 Minuten bei 37°C. Die Proben werden auf Eis abgestoppt, jeweils 400 µl einer Mischung aus Dowex-Wasser-Ethanol (1+1+1) zugegeben, gut gemixt und wieder 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße werden 20 Minuten bei 3000 × g zentrifugiert, 200 µl Aliquoten des Überstandes werden direkt in Szintillationsgefäße überführt. Nach der Zugabe von 3 ml Szintillator werden die Proben im Betacounter gemessen. Die jeweils unspezifischen Enzymaktivitäten werden in Gegenwart von 100 µM IBMX bei der Bestimmung der PDE 3 ermittelt und von den Testwerten subtrahiert.

Für die erfindungsgemäßen Verbindungen wurden bezüglich der Inhibition der Phosphodiesterase 3 IC₅₀-Werte im Bereich von 10⁻⁹ bis 10⁻⁵ M bestimmt.

Beispielsweise wurden für ausgewählte Ausführungsbeispiele folgende Werte bestimmt:

Beispiel	IC ₅₀ [μmol/l]
1	0,02
5	0,04
7	0,07
8	0,07

Inhibition der Phosphodiesterase 5

Die PDE 5-Aktivität wird in Enzympräparationen aus humanen Thrombocyten bestimmt. Humanes Blut wurde mit Citrat anticoaguliert. Durch eine Zentrifugation bei 700 × g für 20 Minuten bei Raumtemperatur wird das thrombocytenreiche Plasma im Überstand von den Erythrocyten und Leukocyten getrennt. Die Thrombocyten werden durch Ultraschall lysiert und im PDE 5-Assay eingesetzt.

Die Phosphodiesterase-Aktivität wird mit einigen Modifizierungen nach der von Thompson et al. beschriebenen Methode bestimmt. (Thompson, W. J.; Appleman, M. M., Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the enzyme. Adv. Cycl. Nucl. Res. 1979, 10, 69–92).

Die Reaktionsmischungen enthalten 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂, die Inhibitoren in variablen Konzentrationen, die Enzympräparation sowie die zur Erfassung des einzelnen Isoenzymes PDE 5 notwendigen weiteren Komponenten (siehe unten). Durch die Zugabe des Substrates 0,5 μM [³H]-cGMP (ca. 6000 CPM/Test) wird die Reaktion gestartet. Das Endvolumen beträgt 100 μl. Testsubstanzen werden als Stammlösungen in DMSO angesetzt. Die DMSO-Konzentration im Reaktionsgemisch ist 1% v/v. Bei dieser DMSO-Konzentration wird die PDE 5-Aktivität nicht beeinflusst. Nach dem Start der Reaktion mittels Substrat-Zugabe werden die Proben 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch ein Erhitzen der Testtubes für 2 Minuten auf 110°C wird die Reaktion gestoppt. Die Proben bleiben für weitere 10 Minuten im Eis. Nach der Zugabe von 30 μl 5'-Nukleotidase (1 mg/ml, aus einer Schlangengiftsuspension aus *Crotalus adamanteus*) erfolgt eine Inkubation für 10 Minuten bei 37°C. Die Proben werden auf Eis abgestoppt, jeweils 400 μl einer Mischung aus Dowex-Wasser-Ethanol (1+1+1) zugegeben, gut gemixt und wieder 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße werden 20 Minuten bei 3000 × g zentrifugiert. 200 μl Aliquotes des Überstandes werden direkt in Szintillationsgefäße überführt. Nach der Zugabe von 3 ml Szintillator werden die Proben im Betacounter gemessen. Die jeweils unspezifischen Enzymaktivitäten werden in Gegenwart von 100 μM IBMX bei der Bestimmung der PDE 5 ermittelt und von den Testwerten subtrahiert.

Für die erfindungsgemäßen Verbindungen wurden bezüglich der Inhibition der Phosphodiesterase 5 IC₅₀-Werte im Bereich von 10⁻⁹ bis 10⁻⁵ M bestimmt.

Beispielsweise wurden für ausgewählte Ausführungsbeispiele folgende Werte bestimmt:

Beispiel	IC ₅₀ [μmol/l]
1	0,01
5	0,12
7	0,10
8	0,07

Induktion der NO-Produktion in Fibroblasten (Ratte)

Fetale Lungen-Fibroblasten der Ratte (Rat fetal lung fibroblast cells RFL-6) stellen ein geeignetes Medium dar, um die Beeinflussung der Wirkung von NO auf intrazelluläre cGMP-Spiegel zu untersuchen (Ishii et al. 1991). Der Grundmechanismus ist auf die glatte Gefäßmuskulatur übertragbar.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen verstärken konzentrationsabhängig den durch den NO-Donor S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin induzierten Anstieg der intrazellulären cGMP-Spiegel.

So induziert die Verbindung 1 beispielsweise bei einer Konzentration von 0,010 μmol/l signifikant einen Anstieg des cGMP-Spiegels. Die Wirksamkeit von Verbindung 1 ist dabei 10 000fach stärker als diejenige, die durch Verwendung des unspezifischen PDE-Inhibitors 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) erreicht wird.

Kreislaufanalyse am narkotisierten Beagle-Hund

Für diese Untersuchung wurden 4 männliche Beagle-Hunde mit einer Körpermasse von 9,0 bis 15,0 kg verwendet. Die Tiere wurden mittels 80 mg/kg Cloralose und 400 mg/kg Urethan intravenös narkotisiert. Die Hunde wurden intubiert, jedoch nicht künstlich beatmet.

Anschließend erfolgte die Präparation der A. brachialis zur Aufnahme des peripheren Blutdruckes. Für die Registrierung des systolischen/diastolischen linksventrikulären Druckes wurde über die rechte A. carotis ein Micro-Tip-Katheter eingeführt. Das Herzminutenvolumen wurde mittels Thermodilution bestimmt.

Dafür wurde ein Swan-Ganz-Katheter über die V. femoralis eingeführt. Der Katheter wurde so positioniert, daß über dessen Spitze der Blutdruck in der A. pulmonalis erfaßt werden konnte. Es wurden 3,0 ml physiologischer Kochsalzlösung (Temp. 4,0°C) injiziert und aus der Änderung der Temperatur im Aortenstamm das Herzminutenvolumen bestimmt.

Die Ableitung des Oberflächen-EKGs erfolgte von den Gliedmaßen. Die Auswertung der EKG-Parameter erfolgte automatisch.

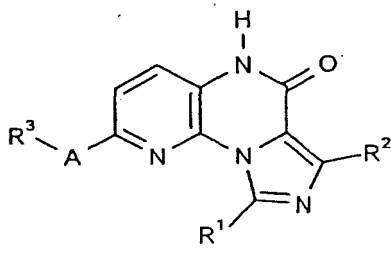
Die Erfassung und Berechnung aller Blutdruckwerte erfolgte mit einem computergestützten System.

In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß beispielsweise die erfindungsgemäße Verbindung 1 nach intragastraler Applikation im Dosisbereich von 0,25 bis 3,0 mg/kg dosisabhängig die Kontraktionskraft des Herzens (Anstieg der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit bis auf das 4fache) mit einer Steigerung des Herzminutenvolumens bis auf das Doppelte verstärkt. Trotz der starken Steigerung der Herzarbeit stieg der arterielle Blutdruck nur initial leicht an und die Druckamplitude erhöhte sich. Höhere Dosierungen senkten den systolischen Blutdruck leicht.

Trotz der immensen und langanhaltenden Steigerung der Herzleistung durch die Verbindung 1 wurden keine hypoxisch bedingten Arrhythmien oder Extrasystolen beobachtet, was die starke coronardilatatorische Wirkung belegt.

Patentansprüche

1. Verwendung von Imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinonen der Formel 1



worin

A für O oder NH steht,

R¹ und R² gleich oder verschieden sein können und

Wasserstoff, sowie

-C_{1...5}-Alkyl, geradkettig oder verzweigt, sowie

ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C_{1...6}-Alkyl, -S-C_{1...6}-Alkyl

bedeuten können und

R³ für Wasserstoff, sowie

-C_{1...5}-Alkyl, geradkettig oder verzweigt, sowie

ggf. ein- oder mehrfach substituiert mit -OH, -SH, -NH₂, -NO₂, -CN, -COOH, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C_{1...6}-Alkyl, -S-C_{1...6}-Alkyl oder Phenyl

steht,

als therapeutische Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen.

2. Verwendung physiologisch verträglicher Salze der Verbindungen nach Formel 1 gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch Neutralisation der Basen mit anorganischen oder organischen Säuren bzw. durch Neutralisation der Säuren mit anorganischen oder organischen Basen bzw. durch Quaternierung tertiärer Amine zu quaternären Ammoniumsalzen, als therapeutische Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen.

3. Bei Verbindungen nach Formel 1 gemäß Anspruch 1 und 2 mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom die Verwendung dieser Verbindungen in der D-Form, der L-Form und D,L-Mischungen sowie im Falle von Verbindungen nach Formel 1 mit mehreren asymmetrischen Kohlenstoffatomen die Verwendung der diastereomeren Formen und deren Mischungen als therapeutische Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen.

4. Von den Verbindungen nach Formel 1 gemäß Anspruch 1 bis 3 besonders eine der folgenden Verbindungen:

8-Methoxy-3-methyl-1-propyl-imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinon;

8-Methoxy-imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinon;

8-Methoxy-3-methyl-imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinon;

8-Methoxy-1-methyl-imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinon;

8-Methoxy-1-propyl-imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinon;

1-Ethyl-8-hydroxy-3-methyl-imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinon;

1-Ethyl-8-methoxy-3-methyl-imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinon;

8-Benzylamino-1-ethyl-3-methyl-imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinon;

1-Ethyl-8-(3-hydroxypropyl)-3-methyl-imidazo[1,5-a]-pyrido[3,2-e]-pyrazinon.

5. Verwendung von Verbindungen nach Formel 1 gemäß Anspruch 1 bis 4 als therapeutische Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen, gekennzeichnet dadurch, daß durch diese Verbindungen in dualer Weise – zugleich und vergleichbar stark – die Phosphodiesterase 3 und die Phosphodiesterase 5 inhibiert werden, wodurch eine positiv inotrope Wirkung am Herzen kombiniert mit einer Druckentlastung durch Dilatation arterieller Gefäße durch ein und denselben Wirkstoff erreicht wird.

6. Arzneimittel, enthaltend eine oder mehrere Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 neben üblichen physiologisch verträglichen Trägern und/oder Verdünnungsmitteln beziehungsweise Hilfsstoffen.

7. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels nach Anspruch 6, gekennzeichnet dadurch, daß eine oder mehrere Verbindungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 mit gebräuchlichen pharmazeutischen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln beziehungsweise sonstigen Hilfsstoffen zu pharmazeutischen Zubereitungen verarbeitet bezie-

ungsweise in eine therapeutisch anwendbare Form gebracht werden.

8. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel 1 gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 und/oder von pharmazeutischen Zubereitungen nach den Ansprüchen 6 und 7 allein oder in Kombination untereinander oder in Kombination mit Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln beziehungsweise sonstigen Hilfsstoffen.

9. Verwendung der Verbindungen gemäß Anspruch 1 bis 4 als therapeutische Wirkstoffe zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung der Herzinsuffizienz, von pulmonaler Hypertonie und Gefäßerkrankungen, die mit einer Minderdurchblutung einhergehen, besonders bevorzugt mittels oraler, intravenöser, intramuskulärer, subcutaner, parenteraler, buccaler oder sublingualer Applikation.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -